

R. Bocquentin<sup>1</sup>P. Very<sup>1</sup>G. Duvallet<sup>1</sup>

# Cinétique des anticorps après traitement trypanocide chez des bovins infectés expérimentalement ou naturellement. Intérêt épidémiologique

BOCQUENTIN (R.), VERY (P.), DUVALLET (G.). Cinétique des anticorps après traitement trypanocide chez des bovins infectés expérimentalement ou naturellement. Intérêt épidémiologique. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, 43 (4) : 479-483

La cinétique des anticorps anti-trypanosomes a été étudiée en immunofluorescence indirecte (IFI) et en ELISA chez des bovins infectés expérimentalement par *Trypanosoma congolense* ou naturellement dans une zone à forte pression glossinaire. Les anticorps ne sont plus décelables dans le plasma des animaux 4 mois après le traitement en utilisant la technique ELISA et 6 mois après en utilisant la technique IFI. Ces résultats présentent un intérêt épidémiologique. En effet, il apparaît possible d'affirmer que des sérums positifs correspondent à des infections actives, en l'absence de réaction croisée, s'il n'y a pas eu de traitement trypanocide depuis 4 ou 6 mois, selon la technique utilisée. **Mots clés** : Bovin - Trypanosomose - *Trypanosoma congolense* - Anticorps - Immunofluorescence indirecte - ELISA - Trypanocide.

## INTRODUCTION

En Afrique, la trypanosomose est une cause importante de morbidité et de mortalité chez les bovins domestiques dans les zones infestées de glossines.

La mise en évidence du parasite dans un des milieux biologiques de l'animal est le seul diagnostic de certitude, mais les techniques de parasitologie actuellement disponibles sont peu sensibles.

La détection d'anticorps anti-trypanosomes par une méthode immunologique est beaucoup plus sensible. Les techniques les plus utilisées sont l'ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) et l'IFI (immunofluorescence indirecte) mais leur interprétation, dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques, est difficile. Une réponse positive peut être le résultat d'une réaction croisée avec d'autres antigènes, d'une infection active ou bien d'une cicatrice immunologique suite à un traitement trypanocide ou une guérison spontanée.

Une réponse partielle à ces questions est apportée par l'étude de la cinétique des anticorps anti-trypanosomes après traitement trypanocide chez des bovins infectés expérimentalement par *Trypanosoma congolense* et des bovins infectés naturellement.

1. Centre de Recherches sur les Trypanosomoses Animales (CRTA), 01 BP 454, Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso.

Reçu le 3.4.1990, accepté le 31.8.1990.

## MATÉRIEL ET MÉTHODE

### Bovins

Pour l'infection expérimentale n° 1, dénommée TC5, 5 zébus et 9 taurins Baoulé nés au CRTA et élevés dans une étable sous moustiquaire, à l'abri de toute piqûre de vecteur, ont été infectés cycliquement, à l'âge de 10-12 mois, avec *Glossina morsitans submorsitans* (femelles issues de la colonie du CRTA). Six animaux non infectés étaient conservés comme témoin.

Après étude de l'évolution de l'infection chez ces animaux (4), ceux-ci ont été traités au Bérénil<sup>ND</sup> (acéturate de diméthylazène, 7 mg/kg). Le traitement correspond, suivant les animaux, aux jours 80 à 93 après l'infection. Les animaux témoins ont également été soumis au traitement.

Pour l'infection expérimentale n° 2, dénommée R1, 5 taureaux de race Baoulé, âgés de 6 à 7 ans, ont été infectés par injection sous-cutanée de 10<sup>4</sup> *T. congolense* du stock Karankasso/83/CRTA/57. Un autre taureau de même âge est conservé comme témoin.

Après étude de l'impact de cette trypanosomose sur leur fonction sexuelle (3), ces animaux ont été traités 147 jours après l'infection (Bérénil<sup>ND</sup>, 7 mg/kg). Des prélèvements de plasma ont été réalisés jusqu'au jour 98 après le traitement.

Pour l'infection naturelle, les bovins ont été choisis parmi les animaux placés, pour une expérience de sélection, dans une zone à forte pression glossinaire (2). A la fin de cette expérience, les animaux ont été traités (Bérénil<sup>ND</sup>, 7 mg/kg) et ramenés à la ferme de Banankélédaya, à l'abri de réinfections. Les animaux choisis n'ont pas présenté de rechute après le traitement.

### Trypanosomes

Pour les infections expérimentales, il a été utilisé un clone de *T. congolense* (n° 12 du 24.01.86) provenant du stock Karankasso/83/CRTA/57, isolé près de Bobo-Dioulasso. Ce stock a déjà été utilisé au CRTA sur un modèle murin d'étude de la trypanotolérance (6).

Cinétique des anticorps

Après le traitement trypanocide, du plasma a été prélevé sur les bovins à intervalles variables suivant les expérimentations et conservé au congélateur (- 20 °C).

La cinétique des anticorps a été étudiée par IFI et ELISA. La réaction d'IFI est réalisée suivant un protocole habituel, sur frottis de sang de souris parasitées par *T. congolense* (stock Karankasso/83/CRTA/57). Le conjugué fluorescent utilisé est un sérum de mouton anti-IgG bovines, marqué à la fluoescéine (Serotec). La lecture est faite avec un microscope Orthoplan (Leitz) équipé du système optique suivant : objectif x 40, oculaire x 6,3, lampe à vapeur de mercure HBO-100 et illuminateur de Ploem (Ploemopak 2) muni des filtres spécifiques pour la fluoescéine.

La réaction ELISA est réalisée suivant un protocole optimisé déjà décrit (1). L'antigène pour cette réaction est préparé à partir du même stock que l'IFI. La lecture est faite sur un appareil Titertek Multiskan<sup>ND</sup> muni d'un filtre à 405 nm.

RÉSULTATS

Immunofluorescence

Les résultats de l'infection expérimentale n° 1 (TC5) sont regroupés dans le tableau I en fonction du titre observé. Ceci permet de calculer, pour chaque jour de prélèvement, la moyenne géométrique des titres (MGT) selon la formule de WAUGH (7) :

MGT = antilog Σ f(logx)/N

x = titre en anticorps, f = nombre de sérums par titre, N = nombre total de sérums.

La colonne MGT donne le résultat pour l'ensemble des 14 animaux jusqu'au jour 32, puis 13 en raison de la mort du zébu n° 708 au jour 46 après traitement. Les colonnes suivantes indiquent la MGT calculée pour les zébus et pour les taurins Baoulé séparément.

TABLEAU I Distribution des sérums de l'infection n° 1 en fonction du titre observé en IFI et du jour après le traitement. Calcul de la moyenne géométrique des titres (MGT).

Jour	Titre						Nbre sérums	MGT	MGT zébus	MGT Baoulé
	640	320	160	80	40	20				
1	3	7	4	0	0	0	14	305	320	296
11	0	7	3	3	1	0	14	177	243	148
32	0	2	4	5	3	0	14	102	53	148
60	0	0	0	8	5	0	13	61	57	63
88	0	0	0	7	6	0	13	58	57	59
116	0	0	0	4	6	3	13	42	48	40
144	0	0	0	2	8	3	13	38	40	37
179	0	0	0	0	7	6	13	29	34	27

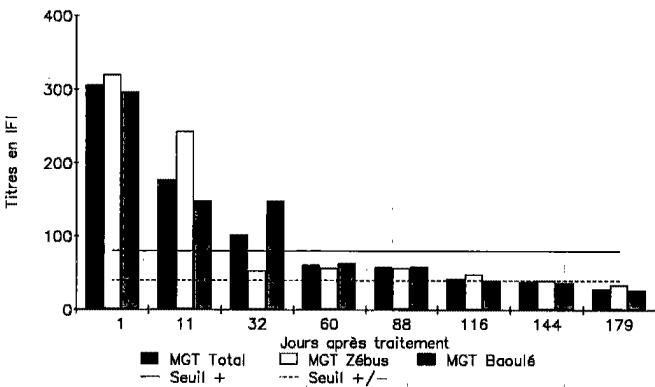


Fig. 1 : Cinétique des anticorps en IFI après traitement trypanocide à J0 (infection n° 1).

Ces résultats sont présentés sur la figure 1 où sont indiqués les seuils de positivité (1/80) et de suspicion (1/40) déterminés par le laboratoire.

Les titres en anticorps chutent rapidement après le traitement et deviennent inférieurs au seuil de positivité dès le jour 60 et négatifs dès le jour 144. Les animaux témoins n'ont jamais montré de titre supérieur à 20.

Les résultats de l'infection expérimentale n° 2 (R1) sont regroupés dans le tableau II et la figure 2. Les 5 animaux

TABLEAU II Distribution des sérums de l'infection n° 2 en fonction du titre observé en IFI et du jour après le traitement. Calcul de la MGT.

Jour	Titre						Nbre sérums	MGT
	640	320	160	80	40	20		
- 7	2	2	1	0	0	0	5	368
0	4	0	1	0	0	0	5	485
7	4	1	0	0	0	0	5	557
28	2	1	2	0	0	0	5	320
63	1	1	2	0	1	0	5	184
98	1	1	1	0	2	0	5	139

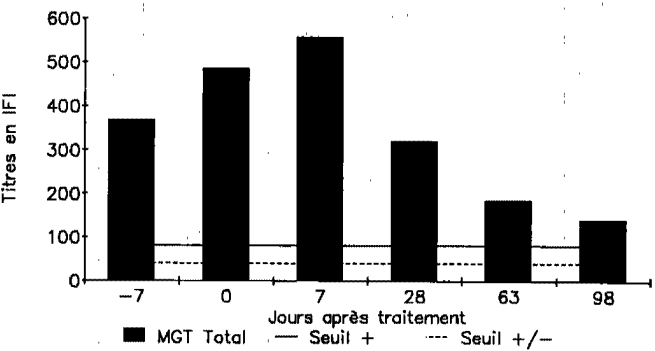


Fig. 2 : Cinétique des anticorps en IFI après traitement trypanocide à J0 (infection n° 2).

infectés ont pu être suivis jusqu'au jour 98 seulement après traitement, pour des raisons logistiques. La MGT chute après le jour 7 post-traitement et atteint la valeur 139 au jour 98. L'animal témoin n'a pas montré de titre supérieur à 20 tout au long du suivi.

Les résultats de l'infection naturelle sont regroupés dans le tableau III et la figure 3. Dix animaux ont pu être prélevés 3 jours avant le traitement et 90 jours après. Trois animaux l'ont été 105 et 113 jours après traitement, puis deux ont été suivis jusqu'au jour 171. La MGT chute après le traitement pour atteindre le seuil de positivité (titre 80) au jour 163.

TABLEAU III Distribution des sérums de l'infection naturelle en fonction du titre observé en IFI et du jour après le traitement. Calcul de la MGT.

Jour	Titre						Nbre sérums	MGT
	640	320	160	80	40	20		
- 3	4	3	3	0	0	0	10	343
90	1	1	6	2	0	0	10	171
105	0	1	0	1	1	0	3	101
113	0	0	1	2	0	0	3	101
163	0	0	0	2	0	0	2	80
171	0	0	0	1	1	0	2	57

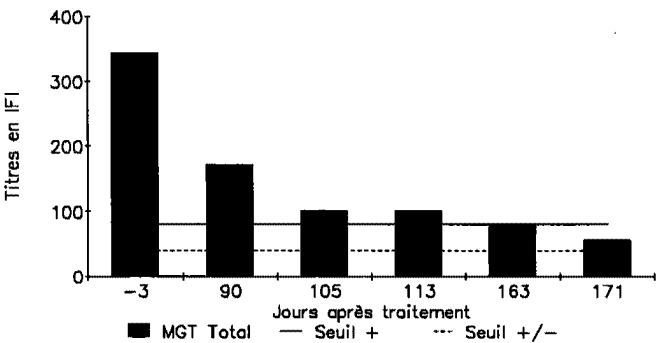


Fig. 3 : Cinétique des anticorps en IFI après traitement trypanocide à J0 (infection n° 3).

ELISA

La cinétique des anticorps après traitement a été étudiée par la technique ELISA sur des animaux de l'expérience TC5 (13 jusqu'au jour 32, 12 ensuite), 5 animaux de l'expérience R1 et 10 animaux de l'expérience d'infection naturelle.

De plus, les 6 animaux non infectés de l'expérience TC5 ont été prélevés à deux dates différentes comme témoin négatif (tabl. IV). Les moyennes de densité optique (DO)

TABLEAU IV Mesure de la densité optique en ELISA à deux dates (avant et après traitement trypanocide) pour 6 animaux non infectés de l'expérience n° 1.

Jour	Effectif	Moyenne	Écart-type
- 10	6	0,330	0,077
206	6	0,281	0,084

obtenues sont bien inférieures aux seuils de suspicion (0,500) et de positivité (0,600) déterminés par le laboratoire (1).

Le tableau V donne les résultats pour les animaux infectés de l'expérience TC5. La première valeur correspond à un prélèvement réalisé 10 jours avant le traitement trypanocide, les valeurs suivantes s'échelonnent de 1 à 206 jours après le traitement. Les valeurs de DO obtenues chutent après le traitement et sont inférieures au seuil de suspicion dès le jour 116.

TABLEAU V Mesure de la densité optique en ELISA en fonction de la date après le traitement pour les animaux de l'infection n° 1.

Jour	Effectif	Moyenne	Écart-type
- 10	13	0,866	0,156
1	13	0,784	0,190
32	13	0,702	0,144
60	12	0,579	0,127
116	12	0,423	0,164
206	12	0,354	0,076

Le tableau VI donne les résultats pour les animaux de l'expérience R1. La moyenne des DO devient inférieure au seuil de suspicion dès le jour 98.

TABLEAU VI Mesure de la densité optique en ELISA en fonction de la date après le traitement pour les animaux de l'infection n° 2.

Jour	Effectif	Moyenne	Écart-type
- 7	5	1,007	0,232
0	5	0,944	0,208
7	5	0,924	0,253
28	5	0,816	0,107
63	5	0,680	0,134
98	5	0,461	0,107

Le tableau VII donne les résultats pour les animaux infectés naturellement. Dans ce cas, la moyenne des DO chute rapidement après le traitement et est inférieure au seuil de suspicion dès le jour 90.

**TABLEAU VII** Mesure de la densité optique en ELISA en fonction de la date après le traitement pour les animaux de l'infection naturelle.

Jour	Effectif	Moyenne	Écart-type
- 3	10	1,004	0,152
90	10	0,371	0,110
105	3	0,352	0,027
113	2	0,310	0,095
124	2	0,298	0,051
164	2	0,215	0,053
171	2	0,222	0,095

La figure 4 représente l'ensemble des résultats en prenant, pour chaque expérience, les valeurs moyennes obtenues. Les valeurs seuils de DO indiquées permettent de vérifier qu'au-delà du jour 100 les valeurs moyennes de DO sont inférieures au seuil de suspicion.

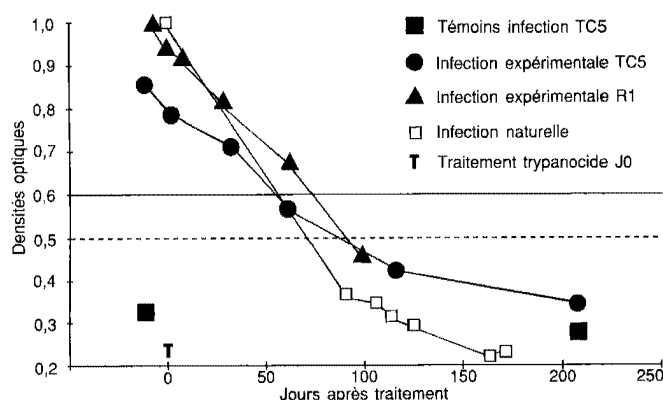


Fig. 4 : Cinétique des anticorps en ELISA après traitement trypanocide pour les infections expérimentales n° 1 (TC5) et n° 2 (R1) et l'infection naturelle.

## DISCUSSION

L'étude de la cinétique et de la détection des anticorps anti-trypanosomes à la suite d'un traitement trypanocide chez des bovins a été réalisée par les techniques d'immunofluorescence indirecte et d'ELISA, en utilisant comme antigène un stock de *Trypanosoma congolense*.

Les seuils de suspicion et de positivité retenus pour la technique IFI sont, respectivement, les titres 40 et 80. Pour la technique ELISA, les valeurs de DO correspondantes sont 0,500 et 0,600 (1).

Dans ces conditions, la technique ELISA apparaît plus sensible pour analyser la chute des anticorps après traitement. En effet, pour les infections expérimentales n° 1 et n° 2 et l'infection naturelle, les sérums deviennent négatifs dès les jours 116, 98 et 90 respectivement, alors qu'avec la technique IFI les valeurs correspondantes sont 114, puis supérieures à 98 et à 171 respectivement. Pour des raisons logistiques, les observations ont été stoppées aux jours 98 et 171 pour l'infection expérimentale n° 2 et l'infection naturelle.

## CONCLUSION

Ces résultats présentent un intérêt épidémiologique. En effet, lors d'enquêtes sérologiques sur le terrain, dans des zones où les traitements trypanocides sont rares (cas des zones d'élevage du bétail trypanotolérant), il apparaît possible d'affirmer, en l'absence de réactions croisées avec d'autres antigènes, que des sérums positifs correspondent à des infections actives. Cela peut être affirmé en l'absence de traitement trypanocide depuis 4 mois par la technique ELISA, et 6 mois par la technique IFI.

Ils sont en accord avec ceux de ZWART *et al.* (8) et les observations de JONGEJAN *et al.* (5).

Des recherches sont actuellement en cours pour étudier l'éventualité de réactions croisées en IFI et/ou ELISA avec d'autres parasites, en particulier *Trypanosoma theileri*, fréquemment rencontré dans la zone d'étude.

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le Pr G. UILENBERG, le Dr P.H. CLAUSEN et M. Issa SIDIBÉ pour les corrections apportées au manuscrit, ainsi que le Dr R. GIDEL, directeur du CRTA, pour l'autorisation de publication.

**BOCQUENTIN (R.), VERY (P.), DUVALLET (G.).** Kinetics of antibodies after a trypanocid treatment in experimentally or naturally infected cattle. Epidemiology interest. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (4) : 479-483

The kinetics of anti-trypanosome antibodies was studied by indirect immunofluorescence (IFI) and ELISA tests in cattle experimentally infected by *Trypanosoma congolense* or naturally infected in an area with a great tsetse pressure. The antibodies were not discerned in the plasma of the animals four months after the ELISA test and six months after with the IFI method. These results are of epidemiological interest. In fact, it is likely that the positive sera corresponded to an active infection (in the absence of a cross reaction) if no trypanocid treatment had been applied for 4 or 6 months in accordance with the technique used. **Key words** : Cattle - Trypanosomiasis - *Trypanosoma congolense* - Antibody - Indirect immunofluorescence test - ELISA - Tripanocid.

**BOCQUENTIN (R.), VERY (P.), DUVALLET (G.).** Cinética de los anticuerpos después de un tratamiento anti-tripanosomiasis en bovinos infectados experimental o naturalmente. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (4) : 479-483

Se estudió la cinética de los anticuerpos anti-tripanosomiasis mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el test ELISA, en bovinos infectados experimentalmente con *Trypanosoma congolense* o naturalmente en una zona de alta densidad de glosinas. Cuatro meses después del tratamiento los anticuerpos no fueron detectables en el plasma de los animales utilizando el test ELISA, ni seis meses después mediante el test IFI. Estos resultados presentan sobre todo un interés epidemiológico. Debido a esto, es posible afirmar que, si no hubo tratamiento anti-tripanosoma 4 o 6 meses antes y según la técnica utilizada, los sueros positivos corresponden a infecciones activas, siempre y cuando no existan reacciones cruzadas. **Palabras claves** : Bovino - Trypanosomiasis - *Trypanosoma congolense* - Anticuerpo - Inmunofluorescencia indirecta - ELISA - Tripanocida.

## BIBLIOGRAPHIE

1. BOCQUENTIN (R.), DUVALLET (G.). Amélioration de la reproductibilité du test ELISA adapté à la détection d'anticorps anti-*Trypanosoma congolense* chez les bovins. *Revue Elev. Méd. vét. Pays trop.*, 1990, **43** (2) : 179-186.
2. CLAUSEN (P.H.), SIDIBÉ (I.), BASSINGA (A.), RICHARD (X.), BAUER (B.), POLHIT (H.). Susceptibility to African trypanosomiasis of West African shorthorn (Baoule) and zebu cattle in Burkina Faso : a comparative study. In : Livestock production and diseases in the tropics, Proceedings of the 6th international conference of Institutes for Tropical Veterinary Medicine, 28 August-1 Sept. 1989. Wageningen, University of Utrecht, 1990. P. 318-320.
3. CLOÉ (L.C.), THIOMBIANO (D.), VERY (P.), CHICOTEAU (P.). Influence d'une trypanosomose expérimentale sur la fonction sexuelle de taureaux Baoulé. In : Séminaire pour les pays en développement d'Afrique sur l'amélioration de la santé et de l'efficacité de la reproduction du bétail à l'aide du radio-immunosage et de techniques connexes, Harare, Zimbabwe, 4-8 sept. 1989.
4. DUVALLET (G.), OUEDRAOGO (A.), PINDER (M.), VAN MELICK (A.). Observations de bovins Baoulé et Zébu, précédemment non infectés, après infection cyclique à *Trypanosoma congolense*. In : Production animale dans les régions d'Afrique infestées par les glossines, Nairobi, Kenya, 23-27 nov. 1987. Nairobi, ILCA-ILRAD, 1988. P. 357-364.
5. JONGEJAN (F.), OOIJEN (C.J.P.G.), ZIVKOVIC (D.), ter HUURNE (A.A.H.M.). Quantitative correlation of parasitological and serological techniques for the diagnosis of *Trypanosoma congolense* infection in cattle. *Vet. Q.*, 1988, **10** : 42-47.
6. ROELANTS (G.E.), PINDER (M.). The virulence of *Trypanosoma congolense* can be determined by the antibody response of inbred strains of mice. *Parasite Immun.*, 1987, **9** : 379-388.
7. WAUGH (A.E.). Element of statistical method. 3rd ed. New York, McGraw-Hill, 1952.
8. ZWART (D.), PERIE (N.M.), KEPPLER (A.), GOEDBLOED (E.). A comparison of methods for the diagnosis of trypanosomiasis in East African domestic ruminants. *Trop. Anim. Hlth Prod.*, 1973, **5** : 79.